

說 明

“用炭疽无菌滤液使动物免疫的初步試驗”、“自制 S. S. 琼脂、麦康基氏琼脂和伊紅美藍琼脂应用于痢疾干菌分离效果的比較”和“紅血球凝集抑制試驗在流行性乙型脑炎診斷上的应用”三文曾載“中国人民解放军医学科学院院刊”1957年第二期。

用炭疽無菌濾液使動物免疫的初步試驗

楊叔雅 馬賢凱

1904 年, Bail 氏⁽¹⁾首先發現用炭疽病變部之水腫液注射於家兔後, 能使該動物獲得對炭疽病的免疫力。以後許多學者均證實此一現象 (如 Okuda 氏⁽²⁾ 1923 年, 及 Matsumoto 氏⁽³⁾ 1924 年, Hruska 氏⁽⁴⁾ 1926 年, Urbain 氏與 Rossi 氏⁽⁵⁾ 1926 年, Stamatin 氏夫婦⁽⁶⁾ 1936 年, Ivanovics 氏⁽⁷⁾ 1938 年等)。

1944 年, 法人 Grabar 與 Staub 二氏⁽⁸⁾ 開始分析炭疽病變部水腫液中關於免疫之有效成分, 彼等發現水腫液中含有兩種多醣類物質, 其中一種能使豚鼠獲得免疫。

1946 年, Cromartie, Watson, Bloom 及 Heckly 諸氏⁽⁹⁾ 在美軍狄克營曾對炭疽病變部水腫液作電泳的分析及免疫學的研究, 並用生理鹽水在低溫下提取水腫組織之浸出液, 過濾後注射於動物, 在家兔中能產生抵抗 10,000 倍致死量炭疽毒菌之免疫力。同年, Gladstone 氏⁽¹⁰⁾ 在英國鑒於上

述炭疽菌在動物體內生長時, 在其周圍能形成具有免疫作用之抗原性物質, 開始設計以人工方法造成與動物體內環境相似之培養基培養炭疽菌, 以此培養物之過濾液注射動物, 獲得與炭疽水腫液注射動物相同之高度免疫力。例如用此濾液於家兔皮內注射 3 次後, 即能抵禦 100,000 倍致死量炭疽毒菌之攻擊。以此濾液注射猴子, 亦能抵禦 100 倍致死量炭疽毒菌之攻擊, 並且在局部不現任何反應。報告中尚提及用同樣方法, 以人血漿作培養基所製成之炭疽濾液在志願試驗者身上作試驗, 亦無不良反應。

為製造一種適於人用炭疽疫苗起見, 作者亦曾進行此方面的試驗。作者所採用的方法是仿照 Gladstone 氏⁽¹⁰⁾ 所報道者: 用一種類似動物體內環境、含有血清的培養基。以後根據他的原則略微作若干修改。茲將作者研究之過程及其結果概述於後:

實驗材料及操作方法

(一) 實驗用菌種

A₄ 炭疽桿菌是前巴斯德研究院保存之炭疽菌種, 從本市一牛奶棚之奶牛分離而得。對小白鼠之致死量為皮下注射 100 個芽胞; 對二公斤重家兔之致死量為皮內注射 170 個芽胞。A₄₃₀ 號炭疽菌係 A₄ 號菌種連續通過小白鼠體內 30 代而獲得的菌株。對小白鼠的平均致死量為皮下注射 30 個芽胞; 對家兔之致死量為 150 個芽胞

以下。A₂ 及 A₁₆ 號菌株係由中國協和醫學院轉來, 在反細菌戰工作中分離出之炭疽菌, 毒力與 A₄ 號菌株相似。

(二) 芽胞懸液製備方法

將菌種接種普通肉湯瓊脂面上, 靜置在 37°C 培養約一星期, 待大部分菌已形成芽胞及大部分繁殖體已溶解, 經塗片顯微鏡檢查, 不含雜菌, 即用適量無菌生理鹽水洗下, 置 75°C 水箱半小時, 以殺死剩餘之

繁殖體，置冰箱中待用。如此保存之芽胞懸液，雖經數月，其毒力及活菌數量均不變。但每次在使用時，仍用傾碟法數活菌之數量。

(三) 炭疽培養濾液之製備方法

1. 培養器皿 150 毫升容量之玻璃平底燒瓶或三角燒瓶，內置 30 毫升培養液，靜置培養。

2. 接種細菌 A_{430} (或 A_2, A_4, A_{16} 號菌株) 的芽胞懸液用鹽水稀釋到每毫升含有 10^5 芽胞的濃度，取此懸液 1 毫升、種入 9 毫升含 0.1% 酵母之肉湯，在 37°C 孵育一小時後，以 2.5 毫升種入 30 毫升之濾液培養基。

3. 濾液培養基之成分

(1) 除另有說明外，所有培養基中半量為動物之血清所組成。牛血清係從屠宰場殺牛時直接放血入消毒器皿中（但殺牛刀及局部皮膚均未經消毒處理），取回後置冰箱中，待次日或第三日、吸出血清，離心後、用 Seitz 石棉板過濾消毒。馬血清係用無菌手術採血，待血清析出後，取血清部分使用，不經過濾。羊血清除在試驗中另有說明外，均按馬血清同樣處理。

(2) 肉湯 濾液培養基中另一半係肉湯；普通肉湯含 1% 蛋白陳（日本貨）、0.3% 牛汁膏（吉利牌；前巴斯德研究院存貨）、0.5% 氯化鈉，用蒸餾水製成。pH 在 6.8 左右。用 120°C 高壓消毒。

(3) 酵母 係大華利食品公司製造之酵母，濃縮到 80% 之酵母浸出汁。

4. 培養方法 濾液培養基接種細菌

後，置於一裝有氣壓表之密封玻璃缸內，抽出空氣、到負 20 厘米汞柱壓，待數分鐘後，用二氧化碳氣體灌入缸內，使恢復到一個大氣壓，關緊後，置 37°C 溫箱內培養 20 小時。

5. 過濾 自培養缸中取出培養物後，經塗片顯微鏡檢查。若無雜菌污染，即用 Seitz E-K 石棉板過濾。過濾時，負壓不超過 35 厘米汞柱。每批濾液均種肉湯，培養十天，觀察是否有細菌生長。不立即用於注射之濾液，置冰箱中保存。

(四) 濾液免疫效價的測定——動物試驗

由於家兔對炭疽之敏感性比較一致，故為測驗炭疽疫苗免疫力較理想之實驗動物，所以濾液之免疫效價均用家兔測定。家兔之來源，除部分係本院動物房飼養者以外，餘係本市各兔牧場供應，品種不一，但均係體重在二公斤左右健康之家兔。免疫注射係用 0.5 毫升濾液在腰背部及右側腹壁作皮內注射，在第 1、3、5、7、9 天，每隔一天、注射一次，在第 16 天、用 3,000—14,000 個 A_4 芽胞混懸於 0.3 毫升之肉湯中，在左側腹壁部作皮內注射（約相當 20—80 倍於平均致死量的毒力）。自注射毒力後第 2 日起，每日記錄注射部之反應及家兔之體溫，觀察到 2 星期，即決定為該次實驗之結果。無免疫力之家兔，一般均在注射毒力後第三日死亡，具不完全或部分免疫力之家兔常延遲到第 5 天或第 6 天死亡；在二百多只實驗家兔中，尚未發現有延遲到 2 星期以後死亡者。

實驗經過及結果

當時由於炭疽濾液的免疫效價僅能用動物活體實驗測定，動物免疫一次、需時很久。每進行一次實驗、需 4 星期左右，方能得出結果。

茲將本文實驗經過及結果概述如下：

最初幾次的試探性試驗係參照 Gladstone 氏⁽¹⁰⁾關於炭疽桿菌當培養在含血清之培養基中，一定接種菌量及一定培養期

限之培養物濾液、能使家兔產生良好免疫之實驗報導。從而安排作者的實驗。由於所有之菌種與原著者所用之菌株不同，同時、不能獲得與原著者所用完全相同之培養基原料，因此、未採用與原著者完全一致的培養方法。在最初四次試探性實驗中，曾試用普通肉湯與不同量(1/2, 1/4, 1/8)及不同種類動物(牛、羊、馬)之血清，混合作為培養基。於每毫升培養液中種入 600 個 A_4 芽胞，培養在 37°C 。16 到 24 小時後、即取出過濾，以 0.2, 0.5 及 1 毫升濾液分三次注射家兔。每隔六天，注射一次。在最後一次注射完畢後，第七天用 150,000 個 A_4 強毒炭疽菌 (約 900 倍家兔致死量) 測定其免疫力。結果、除最初一次實驗有一只家兔能免於死亡，另一家兔死亡時間較對照家兔遲一倍以外，餘均未能獲得陽性結果：注射濾液之家兔與對照家兔幾同時死亡。

自第五次實驗起，實驗方法及培養條

件方面作下列修改：

1. 於普通肉湯培養基中增添 0.05% 酵母浸出汁。
2. 將接種菌量增加到每毫升 830 個芽胞。
3. 培養時間固定在 20 小時。
4. 放置在含二氧化碳之環境中培養。
5. 濾液注射總量從 1.7 毫升增加到 2.5 毫升，並分 5 次注射，每隔一天、注射一次。
6. 測定免疫力所用毒力注射劑量減少到 3,000 個 A_4 芽胞 (約 20 倍致死量)。

除却上述幾點的修改外，其它實驗方法均與上節“實驗材料及操作方法”中所敘述者相同。自採用上列措施以後，於第五次實驗中，12 只注射濾液之家兔有 9 只家兔免於死亡，濾液之綜合保護率為 75%，與列入同一實驗中作為比較之南京獸醫血清廠所製炭疽活菌芽胞疫苗之保護率相似。其結果如表 1。

表 1. 第五次實驗之結果

實驗組別	接 種 物	毒力注射 (A_4 芽胞)	生存數/實驗數 (死亡日期)	各組保護率
1	在基礎培養基中(50%肉湯, 50%血清)增添 0.05% 酵母, 置 CO_2 環境中培養 20 小時, 細菌接種量增加到 830 個/毫升。 接種菌種第一組用 A_{430} ; 第 2 組, A_{12} ; 第三組, A_4 。	3,000 個	4/4	100%
2		3,000 個	3/4(6天)	75%
3		3,000 個	2/4(3天, 5天)	50%
4	南京炭疽芽胞疫苗 (每只家兔注射 0.5 毫升)	3,000 個	3/4(4天)	75%
5	血清肉湯(對照) (每只家兔皮內注射 2.5 毫升)	3,000 個	0/4(3—4天)	0%

表 2. 重複第五次之實驗方法, 用不同的動物之新鮮血清

實驗組別	接 種 物	毒力注射 (A_4 芽胞)	生存數/實驗數 (死亡日期)	各組保護率
1	培養基及其培養條件均與第 5 次實驗相同, 惟第 1 組用的是牛血清; 第 2 組, 馬血清; 第 3 組, 羊血清。 接種菌種用 A_{430} 。	5,000 個	13/14(4天)	93%
2		5,000 個	4/4	100%
3		5,000 個	5/8(4, 5, 7天)	62.5%
4	血清肉湯(對照)	5,000 個	0/4(3—4天)	0%

表 3. 重複第五次實驗的方法, 用陳舊的血清, 並經過濾三次

實驗組別	接 種 物	毒力注射 (A ₁ 芽胞)	生存數/實驗數 (死亡日期)	各組保護率
1	培養基及其培養條件均與第 5 次實驗相同, 惟所用的牛血清置冰箱已 3 星期, 並經 3 次過濾。接種菌種用 A ₁₈₀₀ 。	5,000 個	$\frac{1}{8}$ (3, 3, 3, 4, 4, 5, 6 天)	12.5%
2	血清肉湯(對照)	5,000 個	0/4 (3, 3, 4, 4 天)	0%

表 4. 比較在含二氧化碳之環境中與在普通大氣中培養的濾液免疫效價之區別

實驗組別	培養環境中 CO ₂ 之濃度	pH	毒力注射 (A ₁ 芽胞)	生存數/實驗數 (死亡日期)	各組保護率
1	25 厘米汞柱壓	6.5	5,000 個	4/4	100%
2	25 厘米汞柱壓	6.5	5,000 個	3/4 (6 天)	75%
3	0	7.6	5,000 個	1/4 (4, 5, 6 天)	25%
4	0	7.0	5,000 個	1/4 (3, 4, 5 天)	25%
5	血清肉湯(對照)	7.2	5,000 個	0/4 (3—4)	0%

本表所用的基礎培養基及增添的酵母量均與第 5 次實驗相同。

表 5. 比較不同的培養時間和接種菌量對濾液免疫效價之影響

實驗組別	細菌接種量	培養時間	毒力注射 (A ₁ 芽胞)	生存數/實驗數 (死亡日期)	各組保護率
1	830 個/毫升	12 小時	5,000 個	0/4 (3, 3, 3, 4 天)	0%
2	830 個/毫升	36 小時	5,000 個	0/4 (3, 3, 4, 4 天)	0%
3	830 個/毫升	20 小時	5,000 個	2/4 (4, 4 天)	50%
4	83 個/毫升	20 小時	5,000 個	1/4 (4, 5, 6 天)	25%
5	41,600 個/毫升	20 小時	5,000 個	1/4 (4, 5, 6 天)	25%
6	無菌對照	20 小時	5,000 個	0/4 (3, 3, 3, 4 天)	0%

本表所用為基礎培養基及增添的酵母量均與第 5 次實驗相同。

表 6. 試用入血清代替動物血清, 以及減少培養基中血清含量對濾液免疫效價的影響

實驗組別	接 種 物	毒力注射 (A ₁ 芽胞)	生存數/實驗數 (死亡日期)	各組保護率
1	人血清與肉湯基礎培養基* 按 1:1 等量混合	7,000—15,000 個	9/16 (2, 4, 4, 4, 6, 7, 9 天)	56.2%
2	人血清與肉湯基礎培養基** 按 1:7 比例混合	7,000—15,000 個	9/12 (2, 3, 6 天)	75%
3	牛血清與肉湯基礎培養基** 按 1:7 比例混合	7,000—15,000 個	7/8 (7 天)	87.5%
4	人血清與不含 NaHCO ₃ 的肉湯基礎培養基 以 1:7 比例混合	7,000—15,000 個	0/4 (3, 3, 4, 5 天)	0%
5	血清與肉湯等量混合不接種細菌的對照	7,000—15,000 個	0/12 (2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 5 天)	0%

本表所列實驗培養方法及培養條件均與第五次實驗相同。

* 肉湯基礎培養基之成分為: 蛋白胨 0.8%; 牛汁膏 0.2%; 酵母浸膏 0.16%; 葡萄糖 0.5%; K₂HPO₄ 0.4%; KH₂PO₄ 0.2%; FeSO₄·7H₂O 0.001%; MnSO₄ 0.014%; MgSO₄·7H₂O 0.005%; CaCl₂ 0.005%。

** 肉湯基礎培養基之成分除增加 NaHCO₃, 使其在培養基中最後濃度為 0.03M, 以及增加葡萄糖之濃度至 0.7% 以外, 均與上述 (*) 者相同。

討 論

在最初幾次實驗,作者參照Gladstone氏之方法進行。結果、大多數是陰性。此或由於作者的菌種、培養基的原料、以及培養條件、均與原著者稍有不同。因此,在以後的實驗略加改進:自第5次實驗起,即在基礎培養基中增添0.05% 酵母浸出汁,實行在30毫升培養基中固定接種菌量為25,000個芽胞,並培養於含二氧化碳之缸內約20小時,立即過濾。經過如此改進,作者方開始獲得陽性結果(見表1)。在免疫之12只家兔中,有9只免於死亡,濾液之綜合保護率為75%。從表1亦可看出不同的菌株所產生的濾液均有一定程度之免疫效力。

按照 Gladstone 氏方法的原則所製成之培養基,不但血清部分是不可缺少的,而且所用之血清必須新鮮。若所用之血清保存時間過久,並經過二、三次過濾,則所產生之濾液將降低,或失去其免疫效力(見表2,表3)。從表2(1, 2, 3組)亦可知不同的動物血清之來源對於免疫效力之產生似無甚差別。

良好免疫抗原之形成,需要足量之二氧化碳(見表4)。凡培養於CO₂環境中所得之炭疽濾液能在家兔體內產生75%以上之免疫效力(表4的1—2組)。在此環境中,炭疽桿菌能形成良好之莢膜(約90%以上)。凡培養在普通大氣環境中所得之炭疽濾液僅有25%之免疫效力(表4的3—4組);在此環境中之炭疽桿菌僅有20%左右呈現莢膜。CO₂雖能促進莢膜之形成,但莢膜物質並非免疫抗原。

培養時間及接種菌量對濾液之免疫效力均有一定的影響(見表5)。如接種之適宜菌量為每毫升接種830個芽胞,但培養時間太短(12小時)或太長(36小時),均不

能產生免疫效力。另一方面,如培養於適宜時間(20小時),但接種菌量每毫升為83個芽胞或每毫升41,600個芽胞,僅能產生25%之免疫效力。此次(表5第4組)用適宜菌量每毫升接種830個芽胞,並在適宜的時間(20小時)內作培養,僅能獲得50%之免疫效力,可能是由於血清經過2次過濾的原因。

從表6可見用人血清代替動物血清所製成之濾液亦有一定程度之免疫力(56%保護率)。而此種濾液在人體進行注射時,當可減少由於異種血清蛋白所引起之過敏反應。此外,在肉湯基礎培養基中增添0.03M碳酸氫鈉,並增加葡萄糖的含量時,則培養基中血清之含量可減少到1/8,並毫不影響濾液之免疫效價。在其它條件,完全相同;但不加碳酸氫鈉的培養物濾液中,則不呈任何保護力(見第4組結果)。

培養基中碳酸離子濃度對產生免疫抗原有一定的重要性。在血清含量減少而基礎培養基中增添碳酸氫鈉的濾液免疫效價較未減少血清組略高,此亦可能是由於同樣的原因。因為血清中雖亦含有碳酸氫鈉,但其濃度可由於負壓過濾及放置過久而減少,因而影響製成培養基後所產生的濾液的免疫效價。

在整個實驗過程中,先後曾有161只家兔用濾液免疫,經過三次以上之注射。在皮膚注射部分,除却因濾液內所含血清而引起紅腫、過敏性反應以外,無一家兔因濾液得病,亦無一死亡。因此,作者所注射之濾液是相當安全的,對家兔完全無害。先後列入各次實驗,作為對照之42只家兔,則無一倖免。注射對照家兔之濾液是用同樣方式製作,所不同者,在此種濾液中未接種過炭疽桿菌。因此,說明這種免疫力是

具有特異性質的，不是由於培養基中所含有之血清成分所引起之非特異性的免疫作用。

由於製作濾液的培養基中含有血清，可以引起過敏反應，並且其成分複雜，不易控制，所以目前作者所製成的濾液還不宜作為人用炭疽疫苗之用，為達到作為人用炭疽疫苗的目的，尚須進一步的研究，使在綜合的培養基中（不含血清）產生有效抗原的各種條件。近年來關於此方面的研究工作，亦有許多的文獻報道。如 1954 年的

Wright 氏⁽¹¹⁾及 Belton 與 Strange 二氏⁽¹²⁾，分別用綜合的培養基產生濾過性免疫抗原，並且已經獲得相當好的結果。

作者尚未充分掌握產生高效濾液之各種條件。此需要從炭疽桿菌之營養需要及新陳代謝方面開始，在培養基中各種成分完全一致和精確之條件下，逐一試驗培養基中各種成分對抗原形成之影響，從而全面掌握抗原形成之規律，並進一步提高濾液之免疫效價。

結 論

1. 用炭疽桿菌接種於一定之培養基（50% 肉湯，50% 血清及 0.05% 酵母）在一定的培養條件下，可以產生一種濾過性免疫抗原，對家兔有一定程度之免疫效力。

2. 在培養基中所用的血清必須是新鮮的，且過濾不可超過兩次；否則所產生之濾液對家兔之免疫效價甚低，或全無。

3. 在肉湯基礎培養基中增添碳酸氫鈉及葡萄糖的含量時，則培養基中血清之含量可減少到 1/8，而不致影響濾液之免疫效價。

4. 此種濾過性免疫抗原是具有特異性質的，濾液注射到動物體內是相當安全的，對家兔完全無害。

誌謝 本文著者對丁志瑜同志在本實驗操作中的技術協作表示謝意。

參 考 文 獻

- (1) Bail, O.: Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. X. Die Künstliche Immunität des Kaninchens. *Zbl. Bakt., Abt. I*, **36**: 266, 1904.
- (2) Okuda, S.: Ueber aktive Milzbrandimmunisierung. *Zbl. Bakt., Abt. I*, **80**: 562, 1923.
- (3) Matsumoto, T.: Versuche über Herstellung und Wirkung antiaggressiven Milzbrandserums. *Z. Immunforsch.*, **40**: 402, 1924.
- (4) Hruska, C.: Recherches expérimentales sur le charbon. *Ann. Inst. Pasteur*, **40**: 710, 1926.
- (5) Urbain, A., et Rossi, L.: Vaccination du cobaye contre le charbon par le liquide d'œdème. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **95**: 544—45, 1926.
- (6) Stamatin, N. et Stamatin, L.: L'œdème apparaissant chez la souris après l'inoculation des variétés acapsulgènes de la bactériodie charbonneuse confère l'immunité au lapin. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **122**: 494, 1936.
- (7) Ivanovics, G.: Ueber die Milzbrandimmunität. *Z. Immunforsch.*, **94**: 436, 1939.
- (8) Grabar, P., et Staub, A. M.: Recherches immunochimiques sur la bactériodie charbonneuse. II-Les fractions proteidiques du liquide d'œdème charbonneux et des extraits de *B. anthracis*. *Ann. Inst. Pasteur*, **70**: 129, 1944.
- (9) Chromartle, W. J., Bloom, W. L., and Watson, D. W.: Studies on infection with *B. anthracis*. I. A histopathological study of skin lesions produced by *B. anthracis* in susceptible and resistant animal species. *J. infect. Dis.* 80—81: 1—13, 1947.
- (10) Gladstone, G. P.: Immunity to anthrax: Protective antigen present in cell-free culture

- filtrates. *Brit. J. exp. Path.*, **27**: 394, 1946.
- 11) Wright, G. G., Hedberg, M. A., and Slein, J. B.: Studies on immunity in anthrax. III. Elaboration of protective antigen in a chemically-defined, non-protein medium. *J. Immunology* **72**: 263-269, 1954.
- (12) Belton, F. C. and Strange, R. E.: Studies on a protective antigen produced in vitro from B. anthracis: medium and method of production. *Brit. J. Exp. Path.* **35**: 152, 1954.

自製 SS 瓊脂、麥康基氏瓊脂和伊紅美藍瓊脂應用於痢疾桿菌分離效果的比較

張發良 張方正 周佳敏 陳恆鑫 劉 達 程知義

細菌性痢疾在腸道傳染病中，佔有重要的地位。目前在我部隊中，以及我國各地區，仍然有着廣泛的流行。其原因不僅在於直到目前為止，尚無令人滿意的特異性的預防方法，而具有更重要意義的，是對痢疾的傳染源尚未得到切實有效的控制。細菌性痢疾的傳染源，如衆所周知的，是急性慢性痢疾患者。誠如 Ш.С. Хифен 氏等⁽¹⁾的意見：持久性的痢疾患者在傳染源中扮演着極重要的角色。因而在痢疾的防治工作中，怎樣保證及時發現患者（尤其重要的是非典型患者）和帶菌者，當為首要問題。在診斷問題上，許多學者雖然先後提出了血清凝集反應、半抗原沉澱反應、糞便凝集反應、皮內反應等方法，作為痢疾的輔助診斷，但細菌培養到目前為止，仍然是最基本的方法。而臨床的確診還是以痢疾病原菌的檢出為依據。為了提高病原菌的檢出率，除了注意標本的採集和保存方法，以及多次反覆檢查以外，在培養基的選擇上很早就引起學者們的注意。現在一般被認為比較滿意的培養基，有蘇聯的 Бакто-арар Ж, 和美國 Difco 廠的 S. S. 瓊脂⁽²⁾。近年來 Писаренко 氏⁽³⁾報告的胆鹽

枸橼酸鹽瓊脂、據稱其效果較之 Бакто-арар Ж, 猶有過之。但是上述諸培養基由於其中某些成分，如“Ж”瓊脂中的魚肉水解物和胆鹽，及 Difco S. S. 瓊脂中的三號胆鹽等，我們都還未能獲得有關資料，故而在國內迄未能自製。過去國內常用的培養基仍以伊紅美藍，中國藍和遠藤氏瓊脂為最普遍，但其效果不能令人滿意。近年來我國的細菌學者們對腸道培養基進行了不少的研究，而研究的中心是各種粗製胆鹽或混合胆鹽的製備和改良問題。鄭翼宗氏⁽⁴⁾的透析胆鹽、梁植權氏等⁽⁵⁾的混合胆鹽、以及上海市衛生防疫站⁽⁶⁾的粗製胆鹽等先後問世。這些不同的胆鹽製品經其他學者用以製成 SS 瓊脂、麥康基氏瓊脂，並在實際工作中獲得了良好的結果。

本文僅就以粗製胆鹽製成的 S. S. 瓊脂（簡稱自製 S. S. 瓊脂）、麥康基氏瓊脂和一般常用的伊紅美藍瓊脂三種培養基在 1,266 件糞便標本對痢疾桿菌分離的結果加以比較和討論，以求進一步肯定自製 S. S. 瓊脂的效果，並找出一種抑制性較差的鑑別性培養基，作為自製 S. S. 瓊脂的輔助。

材 料 與 方 法

1. 培養基的製備 所用培養基的成分和製法如下：

(1) 自製 S. S. 瓊脂：見(7)。

(2) 麥康基氏瓊脂：見(8)。

(3) 伊紅美藍瓊脂：見(8)。

2. 標本來源 糞便標本來源有三。大

部分標本都是上海市各醫院送到上海市立醫學化驗所的。絕大多數的患者診斷不詳；少數標本保存在甘油鹽水中，其餘都直接盛放在大口玻璃瓶中。標本送驗到接種，都間隔 24—72 小時，甚至有達四、五天的。一部分標本為從上海市立兒童醫院及上海第一醫學院兒科學院來的；大多數是腸疾患

試 驗 結 果

此次檢查各種不同的臨床診斷的患者糞便標本共 1,266 件，計檢出腸道致病菌 221 株，佔檢查總數 17.5%。其中痢疾菌 215 株為陽性菌株的 97.29%；沙門氏菌 6 株佔 2.71%。

表 1. 三種培養基對病原菌檢出率的比較

培養基	陽性菌株數		總 計		佔陽性 總數%
	痢疾 菌屬	沙門氏 菌屬	實數	%	
自製 S.S. 瓊脂	179	4	183	14.4	82.8
伊紅美藍瓊脂	133	4	137	10.8	62.0
麥康基瓊脂	127	3	130	10.0	58.8

表 2. 任意合用三種培養基中的二種時的效果的比較

培 養 基	陽性菌株數	陽性率	佔總菌株數%	為單用一種培養基之%*		
				自製 S.S.	伊紅美藍	麥康基氏
自製 S.S. 與伊紅美藍陽性	210	16.6	95.0	114.75	153.25	161.54
自製 S.S. 與麥康基氏陽性	204	16.2	92.3	111.47	148.87	156.90
伊紅美藍與麥康基氏陽性	172	13.6	77.8	93.47	125.51	132.30

* 用單獨一種培養基的陽性率為 100% 計算。

以‘自製 S.S. 瓊脂與伊紅美藍瓊脂合用’為較好——計檢出病原菌 210 株，亦即 16.6% 陽性率，佔總陽性菌株數的 95.02%；為單用一種培養基的陽性結果的 114.75% (自製 S.S.)，153.25% (伊紅美藍)，和 161.54% (麥康基氏)。自製 S.S. 與麥康基氏瓊脂合用時，檢出病原菌 204 株，亦即 16.2% 陽性率，佔總陽性菌株數的 92.3%，為單用一種培養基的 111.47% (自製

者，也有診斷不詳及經過綠霉素或胰胺治療的。這部分標本都保存在甘油鹽水中。

3. 檢驗程序 糞便標本送到實驗室後，都立即直接接種到自製 S.S. 瓊脂、麥康基瓊脂及伊紅美藍瓊脂；未用增菌培養基。其餘檢驗程序和所用診斷血清種類都和(9)中描述者相同。

這三種培養基對腸道病原菌的分離率如表 1 所示。

從上表可以看出，自製 S.S. 瓊脂顯然較伊紅美藍瓊脂及麥康基氏瓊脂為優 ($\chi^2 = 12.55$; p 值 > 0.01)。而從伊紅美藍瓊脂和麥康基氏瓊脂所檢得的病原菌相差無幾，比較結果沒有統計學意義 (t 值 $= 0.41 < 2.0$)。

腸道病原菌同時在二種培養基分離出，而在第三種培養基中未檢出的情況，亦復不少。其結果列於表 2。

分析任意配合二種培養基的結果顯示

S.S.)，148.87% (伊紅美藍)，和 156.9% (麥康基氏)。伊紅美藍瓊脂與麥康基氏瓊脂合用時，所分得的陽性菌株數還不及單用一種自製 S.S. 瓊脂好，僅及單用自製 S.S. 瓊脂的 93.47%；但如與單用一種抑制性差的培養基比較，仍然增加到 125.5% (伊紅美藍) 和 132.3% (麥康基氏)。

比較自製 S.S. 瓊脂與伊紅美藍瓊脂合用和自製 S.S. 瓊脂與麥康基氏瓊脂合

用的結果,在統計學上,並無顯著差別(t 值
 $= 0.34 < 2$)。

所所得的 221 株腸道病原菌中有痢疾

菌 215 株,沙門氏菌 6 株。它們的分型結
 果如下:

表 3. 215 株痢疾桿菌的分型

型 別	舒密次氏 痢疾桿菌	福 氏 痢 疾 桿 菌					宋內氏痢 疾桿菌	合 計
		2a型	3 型	4 型	6 型	y 變種		
菌株數	1	24	52	14	5	6	113	215
百分率	0.46	11.17	24.19	6.51	2.33	2.79	52.55	100

6 株沙門氏菌爲:丙羣 *S. bonarensis*
 (VI,VIII:i:enx) 2 株,丁羣 *S. typhi* (IX,
 XII:d:-) 1 株, *S. enteritidis* (IX, XII:

gm:-) 2 株, 和 E 羣 *S. anatum* (III, X;
 eh:1.6) 1 株。

討 論

本實驗進一步證實了我們已往的工作
 結果⁽⁷⁾, 自製 S.S. 瓊脂對革蘭氏陽性菌
 及革蘭氏陰性的大腸菌類都有良好的抑制
 作用,變形菌生長亦不蔓延,故而有可適
 當的增加標本的接種量;加之、它對病原菌
 的生長影響較小, 故而分離率顯著較一般
 選擇性差的培養基(如伊紅美藍、溴麝香草
 酚藍、麥康基氏、中國藍、遠藤氏等)爲高。
 但此培養基仍存在着一些缺點: 首先是在
 抑制非病原菌的同時, 也給病原菌的生長
 帶來一定的影響。試驗結果指出: 若單用
 自製 S.S. 瓊脂時, 至少大約有 18% 左右
 的陽性標本被遺漏;其次在自製 S.S. 瓊脂
 上, 腸球菌的生長仍然較多;乳糖發酵與不
 發酵菌株的菌落顏色雖然可被區別出來,
 但仍然不够鮮明;和其他培養基一樣, 副大
 腸菌的區分是很困難的。這些問題都有待
 今後研究和改進。

很多文獻認爲在使用選擇性很高的
 S.S. 培養基時, 最好併用一種或一種以上
 選擇性較差的鑑別性培養基, 這樣可使在
 S.S. 培養基上發育困難的痢疾菌株得到發
 育的機會。我們觀察的結果表明了: 自製

S.S. 瓊脂與伊紅美藍瓊脂或麥康基氏瓊脂
 合用時, 其檢出率爲單用自製 S.S. 時的
 114.75% (與伊紅美藍瓊脂合用), 或 111.47
 % (與麥康基氏瓊脂合用)。如果從流行病
 學‘爲充分發現非典型患者和帶菌者, 以便
 控制傳染源’的觀點來看, 同時使用二種培
 養基是有一定意義的, 特別是在目前還沒
 有一種令人滿意的腸道分離培養基的情況
 下, 若爲人力、物力所許可, 最好同時使用
 二種以上的分離培養基。至於選用哪一種
 好, 從分離率上來看, 伊紅美藍瓊脂與麥康
 基氏瓊脂間無顯著差異。但我們考慮到
 麥康基氏瓊脂中的牛胆酸鈉或其他胆鹽,
 國內尚不能自給, 雖然它對大腸菌的抑制
 作用和區別乳糖發酵與不發酵的菌株較伊
 紅美藍瓊脂好, 我們仍然建議以伊紅美藍
 瓊脂作爲自製 S.S. 瓊脂應用時的輔助。

在這次 1,266 件大便標本中, 三種培
 養基合用時的檢出率僅達 17.5%。檢查陽
 性率低的原因可能有以下幾點: (1) 標本來
 源廣泛;除痢疾患者外, 尚有其他疾病患者
 和少數帶菌檢查者。 (2) 標本保存時間過
 長, 其中最長的有達 4.5 天者, 一般都在 24

小時以上，且有部分標本未用甘油鹽水保存。(3)標本材料過少，有的已經乾枯，以致接種量甚少。(4)一部分標本係在服藥後

採取的。為提高檢出率，這些缺點是值得提出，以便引起注意的。

結 語

在 1,266 件大便標本中，同時用自製 S.S. 瓊脂，伊紅美藍瓊脂和麥康基氏瓊脂作腸道病原菌的分離，結果說明自製 S.S. 瓊脂應用於痢疾桿菌的分離遠較一般鑑別性培養基為優越。如能根據條件，另選一種

選擇性差的培養基作為自製 S.S. 瓊脂應用時的輔助，則可使某些在 S.S. 瓊脂上不能發育的痢疾菌株得到生長的機會，以提高痢疾菌的檢出率。

附誌 參加本工作的還有鄭鏡洲、夏瑞和張岩三位同志。

參 考 文 獻

- [1] С. В. Гусляк: Эпидемиология и профилактика Дизентерии, 1956.
- [2] Difco manual, 1943.
- [3] С. Ф. Будес: Лабораторное Дело 1956:2.
- [4] 鄭興宗: 1956 年全國微生物學代表會議論文選集。
- [5] 梁植權, 方慈祺: 中華醫學雜誌 (7) 640, 1955.
- [6] 尤錫根, 張鴻富: 常用培養基製造, 衛生防疫活葉文選第 10 號, 1955 年 6 月, 上海市衛生防疫站編印。並見 [7]。
- [7] 程知義等: 人民軍醫 (10) 17—20, 1956.
- [8] 葉天星: 實用細菌學之實驗指導 1950.
- [9] 程知義等: 人民軍醫 (10) 12—16, 1956.

紅血球凝集抑制試驗在流行性 乙型腦炎診斷上的應用

毛 樹 章

在流行性乙型腦炎的實驗診斷上，我國各地普遍應用補體結合反應及中和反應。腦炎病毒的血球凝集試驗成功以來，把紅血球凝集抑制試驗應用在診斷上的報告尚不多見⁽¹⁻⁸⁾。作者在過去工作的基礎上，考慮把此一反應應用在實際中的可能

性，於 1956 年間就上海第二醫學院附屬廣慈醫院傳染病房收治的 47 名入院時診斷為流行性乙型腦炎患者的血清、用紅血球凝集抑制試驗作了檢驗。本文即報告此次檢驗之結果，並就其與補體結合反應間的關係，與臨床診斷間的關係作一初步之分析。

材 料 和 方 法

1. 病毒毒株 蘇聯毒株——株號 M-47⁽⁴⁾——得自中央生物製品鑑定所。

2. 血球凝集素之製備 取經 M-47 株流行性乙型腦炎病毒感染、發病典型、無細菌污染之小白鼠鼠腦，研碎，製成 10^{-2} 之乳懸液，輕度遠心之後，取上清液同時感染乳鼠數窩。每隻乳鼠腦內接種 0.02 毫升。感染後，放回母鼠身側，注意觀察。俟乳鼠發病垂死，即行取出，以無菌手續解剖取腦，秤其重量，將腦組織放在搖珠瓶中充分搖碎後，按 1 克鼠腦加液體 10 毫升的比例，加入 pH 為 7.5 之 M/100 磷酸鹽緩衝食鹽水，用力搖勻，置於 4°C 冰箱中浸漬 14—18 小時。浸漬後，放在斜角式離心機中，以每分鐘旋轉 4,000 轉之速度遠心沉澱 30 分鐘，吸取上清液，經細菌培養證實無菌後，貯存在 4°C 冰箱中，備供實驗之用。

如此製備之血球凝集素可在 4°C 冰箱中保存 3 個月以上。

3. 紅血球懸液 用不足一週齡之萊亨

雞血球。平時保存在 Alsever 氏液中。試驗時洗滌三次，加 pH 為 6.8—7.0 之 M/100 磷酸鹽緩衝鹽水，配成 0.25% 血球懸液。一般在 4°C 冰箱中，可保存一週；若見有輕度溶血象，即行棄去，重新配製。

4. 血清 取血，分得血清後，放在 -20°C 冰箱中貯存。試驗時，取血清加 pH 6.8—7.0 之 M/100 磷酸鹽緩衝鹽水作 1:16 稀釋，然後加入等量之戊醇 (E. Merck, C. P.)，放在振盪機上振盪 15 分鐘。遠心，吸出血清，置放另一試管中，加入等量之四氯化碳 (工業用)，重行振盪。10—15 分鐘後，再行遠心沉澱。吸出位於上部之血清，在 62°C 水浴箱中滅活 30 分鐘。當日進行試驗。

5. 血球凝集反應 (血球凝集素之滴定)

在一列直徑為 10 毫米之試管中各加入 0.5 毫升之 M/100 磷酸鹽緩衝食鹽水 (pH 7.0)。於第一管中加入血球凝集素 0.5 毫升，依次向下作等倍稀釋。稀釋完畢後，每管各加 0.25% 雞血球懸液 0.5 毫升。搖

勻，置入 37°C 恆溫箱內，75 分鐘後取出，按血球在管底之形狀記錄結果。以稀釋最高，而又能引起血球完全凝集的血凝素稀釋度作為一個凝集單位。

6. 血球凝集抑制試驗 血球凝集素經滴定之後，取試管排列架上。每份血清用試管一排，自第二根試管起，各加入 pH 7.0 之 M/100 磷酸鹽緩衝食鹽水 0.25 毫升。然後將血清各 0.25 毫升加注在第一及第二兩根試管中。自第二根試管起，依序向下作等倍稀釋。完畢後，每管加入血球凝集素兩個凝集單位，量 0.25 毫升。搖勻。每管各加注 0.25% 雞血球懸液 0.5 毫升，重行搖勻，置於 37°C 之恆溫箱中。75 分鐘後，仍按血球在管底形成之形狀記錄結果。以稀釋最高，而能使血球凝集現象抑制完全的血清稀釋度（加添血球凝集素及血球懸液以前的稀釋度）作為該血清之血球凝集抑制滴度。

結

此次檢驗用過臨床初步診斷為流行性乙型腦炎患者 47 名的血清 139 份；每名患者的血清至少均有兩次。經與臨床最終診斷核對：確診為流行性乙型腦炎者 37 名，未能肯定為腦炎者 3 名，否定為腦炎者 7 名。在此 40 例患者中，經血球凝集抑制試驗檢得陽性者 18 例，佔 45%，可疑者 5 例，佔 12.5%，二者共佔此受檢例數的 57.5%；陰性者 17 例，為 42.5%。在補體結合試驗的結果方面，檢得為陽性者 5 例，為 12.5%，可疑者 1 例，為 2.5%，二者共佔此受檢例數的 15%；陰性者 34 例，為 85%。現將此兩種反應檢得結果間之相互關係列於表 1。

從表 1 中可以看出：補體結合反應中陽性的 5 例在血球凝集抑制試驗中亦是陽性，可疑的 1 例在血球凝集抑制試驗中，亦屬可疑。此外，在分析二者的關係時，

7. 對照 反應時，用 1:16 之血清一管，不加血球凝集素，作為血清對照。血球凝集素對照用 4 個，2 個，1 個，1/2 個單位的血球凝集素各一管，另用一血球對照。

反應完了時，血清對照及血球對照均應為陰性（無凝集）。血球凝集素對照中一個凝集單位及其以上者均應有完全之凝集，1/2 個凝集單位的一管應凝集不全。如是，該次試驗認為有效；否則重做。

8. 結果之判定 在血球凝集抑制試驗中，以第二份血清之血球凝集抑制滴度高於第一份血清滴度達四倍或四倍以上者作為陽性，滴度昇高兩倍者定為可疑，降低兩倍者亦定為可疑⁽⁵⁾。1:16 以下者為陰性。

9. 補體結合反應* 用微量反應法⁽⁶⁾進行。反應中使用 Casals 氏⁽⁷⁾醋酐乙醚抗原；補體為兩個完全單位，在 4°C 中結合 14—16 小時。

果

表 1. 流行性乙型腦炎患者血清血球凝集抑制試驗與補體結合反應結果之比較(40例)

		血 球 凝 集 抑 制 試 驗			
		陽性	可疑	陰性	共計
補體結合反應	陽性	5	0	0	5
	可疑	0	1	0	1
	陰性	13	4	17	34
共 計		18	5	17	40

作者用 χ^2 法進行測驗。計算結果 $\chi^2 = 7.919$ 。按本例之自由度為 4，故 $0.05 < p < 0.10$ 。p 值甚小，表明此兩種反應的結果雖然不盡符合，但依然有顯著的關係存在。

關於血球凝集抑制抗體及補體結合抗

* 補體結合反應結果係上海市防疫站陳希聖醫師供給之材料。

體在出現時間上的比較，根據作者此次的試驗，列於表 2。

表 2. 陽性血清反應*出現日期之比較

病日	血球凝集抑制試驗	補體結合反應
1—	8	0
6—	4	0
11—	4	0
16—	2	2
21—	3	1
26—	1	1
31—	0	1
36—	1	1
共計	23	6

* 包括可疑例在內。

從表 2 中可以看出：在本病的初期(1—5 日)，血球凝集抑制抗體即已出現者，有 8 例，佔到 34.8%；到疾病的第 15 病日，已達到 12 例，即 52.17%。補體結合抗體須到第 15 病日以後，方始出現。

至於血球凝集抑制試驗導出的實驗診斷與臨床診斷間的相互關係，同樣可由表

討

自從血球凝集抑制試驗在流行性感胃的實驗診斷上具有用途以來，許多學者都採用此一比較簡便的方法，作大量的調查研究工作，取得極大的成績。此次作者在嗜神經性病毒傳染的流行性乙型腦炎方面用它作初步的嘗試，檢驗上海市 1950 年部份流行性型腦炎患者的血清。其檢出率為 45%，比補體結合反應的檢出率 12.5% 略高。1952 年日本學者北岡正見氏⁽¹⁾的報告亦認為血球凝集抑制試驗比較敏感。但是 X^2 測驗的結果，它們之間的差異是不顯著的。此次試驗中兩種試驗的相差極可能只是幾許技術上的原因。如果採用比較敏感的補體結合抗原及較少量的補體，補體結合反應的檢出率就會提高，而且亦能較早

表 3. 流行性乙型腦炎患者臨床診斷和實驗診斷間之關係(47例)

		臨 床 診 斷			
		陽性例	可疑例	陰性例	共 計
實驗診斷	陽性例	18	1	0	19
	可疑例	4	0	0	4
	陰性例	15	2	7	24
共 計		37	3	7	47

3 及計算表明。

此中 7 名為臨床最終診斷否定為流行性乙型腦炎的患者，在血球凝集抑制試驗上，亦屬於陰性。臨床診斷為可疑的 3 例中，一例從血球凝集抑制試驗上得到實驗診斷的證實(補體結合反應陰性)，另 2 例為陰性。並用 X^2 測驗來探討其間的關係。計算結果得 X^2 為 8.393。今自由度為 4，故 P 值亦介於 0.05 與 0.10 之間。從統計學的觀點看來，此次試驗中臨床診斷與由血球凝集抑制試驗導出的實驗診斷之間具有顯著的關係。

論

查出抗體。蘇聯學者 А. И. Дробышевская⁽³⁾ 氏曾詳細討論過，並應用過。此外，波多野基一氏⁽²⁾ 的報告亦有‘血球凝集抑制試驗不及補體結合反應敏感’的結論。

在另一方面，血球凝集抑制試驗雖然一般比較簡單，可是血球凝集素的精製和血清中非特異性物質的除去仍相當複雜，有待研究改進。所以在分析實驗結果時，作者認為血球凝集抑制試驗的檢出率比較高，但此並不否定補體結合反應的應用價值。此正與‘在流行性感胃方面的工作上，隨補體結合抗原製備方法的進步，其檢出率及優點又重新受到學者的重視’，一般無二。在腦炎方面，血球凝集抑制試驗的實際應用猶正在開始，實驗的例數極少，更宜

採取審慎的態度。可以認為此二種血清反應若予同時應用，必能得到相互輔助的效果。至於血球凝集抑制反應的最終評價，

尚有待於資料的積累，方能得出肯定性的意見。

結 論

1. 本文簡略敘述應用血球凝集抑制試驗於 47 名 139 份流行性乙型腦炎患者血清的結果，並討論其與補體反應間，與臨床診斷間的關係。

2. 試驗結果：血球凝集抑制試驗的檢出率比補體結合反應高。而且抗體的出現亦較早。

3. 從統計學的觀點看來，血球凝集抑

制試驗與補體結合反應之間，與臨床診斷之間均具有顯著的關係。却並無足夠的資料說明血球凝集抑制試驗優於補體結合反應。

4. 此一試驗的實際應用價值當有待資料的積累，方能作出最後的評價；血清處理手續亦有待研究改進。

誌謝 本文得到郭成周教授的指導，又蒙上海市防疫站陳希聲醫師供給補體結合反應的資料，上海第二醫學院附屬廣慈醫院傳染病房王耆煌醫師供給臨床診斷資料，方得完成，敬致謝意！

參 考 文 獻

- [1] 北岡正見，二藤佑三： *Virus* 2:183—186, 1952。
- [2] 波多野基一： *Virus* 2:194—202, 1952。
- [3] 藤田信男： *Virus* 2:202—209, 1952。
- [4] Дробышевская, А.И. и Неустроев, В.Д.: *Нейровирусные инфекции*, стр. 199, Медгиз, 1954。
- [5] Haussmann, H.G., Siegert, R. und Schweinsberg, H.: *Z. Hyg.*, 135:235—253, 1952。
- [6] 宋幹等：流行性乙型腦炎（預防與治療），30 面，人民衛生出版社 1953。
- [7] Casals, J.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 70:339, 1949。
- [8] Дробышевская А.И.: *Нейровирусные инфекции*, стр. 213, Медгиз, 1954。